

Luciana Monteiro Pauka

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS EMBRIOTÓXICOS E DA BIOTRANSFORMAÇÃO
DA FRAÇÃO SOLÚVEL DO PETRÓLEO EM ÁGUA EM PEIXE ZEBRA (*Danio
rerio* – Hamilton, 1822)**

Dissertação apresentada como
requisito à obtenção do grau de
Mestre, pelo Curso de Pós-
Graduação em Farmacologia,
do Setor de Ciências
Biológicas, Universidade
Federal do Paraná.

Orientadora: Prof. Dra. Helena
C. da Silva de Assis

**CURITIBA
2007**




Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em
Farmacologia




PARECER

A Comissão Examinadora de Dissertação de Mestrado “AVALIAÇÃO DOS EFEITOS EMBRIOTÓXICOS E DA BIOTRANSFORMAÇÃO DA FRAÇÃO SOLÚVEL DO PETRÓLEO EM ÁGUA EM PEIXE ZEBRA (*Danio rerio*)”, de autoria da pós-graduanda: LUCIANA MONTEIRO PAUKA, sob orientação da Profª Drª Helena Cristina da Silva de Assis e composta pelos professores: Drª Eliane Dallegrave (CIT/RS); Drª Marisa Fernandes de Castilho (Deptº de Fisiologia - UFPR); Dr. Paulo Roberto Dalsenter (Suplente – Deptº Farmacologia – UFPR). De acordo com o Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, a Pós-Graduanda foi APROVADA. Para a devida publicação o trabalho deve sofrer as modificações sugeridas, que serão conferidas pela sua orientadora. Em Curitiba, 26 de abril de 2007.


Drª Helena Cristina da Silva de Assis (Orientadora-Presidente-UFPR)


Drª Eliane Dallegrave (CIT/RS)


Drª Marisa Fernandes de Castilho (Deptº Fisiologia – UFPR)




Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em
Farmacologia



ATA DO JULGAMENTO DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Ao vigésimo sexto dia do mês de abril do ano de dois mil e sete, às oito horas e trinta minutos, na Sala 198-A da Pós-Graduação em Biologia Celular do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, reuniu-se a Comissão Examinadora da Dissertação de Mestrado de autoria da Pós-Graduanda em Farmacologia, **LUCIANA MONTEIRO PAULKA**, intitulada: "AVALIAÇÃO DOS EFEITOS EMBRIOTÓXICOS E DA BIOTRANSFORMAÇÃO DA FRAÇÃO SOLÚVEL DO PETRÓLEO EM ÁGUA EM PEIXE ZEBRA (*Danio rerio*)", sob orientação da Profª Drª Helena Cristina da Silva de Assis e composta pelos professores: Drª Eliane Dallegrave (CIT/RS); Drª Marisa Fernandes de Castilho (Deptº Fisiologia – UFPR). A Banca Examinadora iniciou os trabalhos. A candidata teve quarenta e cinco minutos para expor oralmente seu trabalho, sendo em seguida argüida durante quinze minutos por cada um dos membros da Banca, e tendo trinta minutos para responder a cada uma das arguições. No final a Comissão Examinadora emitiu o seguinte parecer: aprovada. De acordo com o Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, a Pós-Graduanda foi aprovada. Para a publicação o trabalho deverá sofrer as modificações sugeridas, que serão conferidas por sua orientadora. Nada mais havendo a tratar, a Presidente deu por encerrada a sessão, da qual foi lavrada a presente ata, que será assinada por sua Presidente e pelos demais Membros da Banca Examinadora, em Curitiba, 26 de abril de 2007.


Drª Helena (Cristina da Silva de Assis) (Presidente-Orientadora-UFPR)


Drª Eliane Dallegrave (CIT/RS)


Drª Marisa Fernandes de Castilho (Deptº Fisiologia – UFPR)

AGRADECIMENTOS

São inúmeros os agradecimentos a fazer nesse momento. Muitas pessoas foram envolvidas nessa minha jornada.

Agradeço a meu pai e a minha mãe, Vilmar e Delzy, pelo apoio incondicional em todos os momentos da minha vida. Obrigada por sempre terem acreditado em mim e estejam certos, sem vocês nada disso seria possível.

Agradeço a minha irmã, Ana, que mesmo de longe esteve junto comigo em todos os passos dessa minha caminhada.

Muito obrigada ao meu namorado Marcos, pelo seu incentivo, compreensão nos momentos de ausência, apoio nos momentos de desânimo e carinho nos momentos de alegria. Seus conselhos foram fundamentais para o meu ingresso neste mestrado.

Meus sinceros agradecimentos a minha orientadora, Professora Doutora Helena da Silva de Assis, pela sua orientação, compreensão e paciência em todos os momentos dedicados a mim.

Obrigada aos professores do departamento de Farmacologia, que de uma maneira ou de outra contribuíram para melhorar minha formação profissional e mudaram a minha forma de ver o mundo.

Sinceros agradecimentos também a Eliandra Maria Zandoná, Marcell Maceno e Stéfani Rossi por me ajudarem nas análises realizadas nesse trabalho.

Também não poderia deixar de agradecer a Valcineide Tanobe por ter me fornecido o petróleo utilizado neste estudo.

E finalmente, a todas as pessoas que torceram por mim e que sempre estiveram dispostas a conversar, a me incentivar e que me acompanharam durante este período.

Sumário

LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS	ix
RESUMO	x
ABSTRACT	xi
1. Introdução	1
1.1. Petróleo e a sua fração solúvel	1
1.2. Embriotoxicidade	3
1.3. Biotransformação	4
1.4 <i>Danio rerio</i>	6
2. Objetivos	8
2.1 Objetivo geral	8
2.2 Objetivos específicos	8
Artigo científico - <i>Evaluation of Embryotoxic Effects and Biotransformation of Water Soluble Fraction in Zebrafish (<u>Danio rerio</u>)</i>	9
<i>1 Introduction</i>	10
<i>2 Materials and methods</i>	13
<i>2.1 Maintenance of fish</i>	13
<i>2.2 Test solution</i>	13
<i>2.3 Zebrafish embryo test</i>	13
<i>2.4 Enzymatic assays</i>	14
<i>2.5 Statistical analysis</i>	15
<i>3 Results</i>	15
<i>3.1 Chemical analysis of WSF of crude oil</i>	15
<i>3.2 Embryotoxic effects</i>	15
<i>3.3 Enzymatic analysis</i>	18
<i>4 Discussion</i>	19
<i>5 References</i>	22
3. Considerações Finais	27
4. Referências	28

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO DO <i>Danio rerio</i> EM 24 HORAS	17
FIGURA 2 – DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO DO <i>Danio rerio</i> EM 72 HORAS	18
FIGURA 3 – ATIVIDADE DA GLUTATIONA S- TRANSFERASE EM <i>Danio rerio</i> EXPOSTO A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DA FRAÇÃO SOLÚVEL DO PETRÓLEO EM ÁGUA	19

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – VARIÁVEIS ANALISADAS EM PERCENTAGEM (%) OBSERVADO EM EMBRIÃO DE PEIXE ZEBRA (n=180) EXPOSTOS A FRAÇÃO SOLÚVEL DO PETRÓLEO POR 96 HORAS (<i>Danio rerio</i>)	17
--	----

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

% - por cento

CDNB – 1 Cloro 2, 4 Dinitrobenzeno

°C – graus Celsius

DMSO – dimetil sulfoxido

EROD – etoxiresorufina- *O*- deetilase

FSA – fração solúvel do petróleo na água

GSH – glutathiona

GST – glutathiona S- transferase

HPAs – hidrocarbonetos policíclicos aromáticos

HTP – hidrocarbonetos totais do petróleo

mg - miligrama

mL - mililitros

pH – potencial hidrogeniônico

PM – peso molecular

x g – unidade de centrifugação

RESUMO

A fração do petróleo solúvel em água (FSA) causa impactos ao ecossistema aquático e seus componentes iniciais sofrem transformações químicas ocasionando efeitos nocivos a diversos organismos. Essa fração do óleo cru é constituída por uma complexa mistura de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), fenóis e compostos heterocíclicos contendo nitrogênio e enxofre. Estudos mostram que essa fração é muito tóxica a certas espécies de peixes. O presente estudo avaliou possíveis efeitos tóxicos durante o desenvolvimento embrionário do peixe zebra (*Danio rerio*) e a biotransformação em peixes juvenis da mesma espécie através do estudo das enzimas etoxiresorufina-*O*-deetilase (EROD) e glutathione S-transferase (GST). Os embriões e os peixes juvenis foram expostos a diferentes concentrações da FSA obtidas a partir do óleo cru (15%, 33% e 50%) por 96 horas sendo o desenvolvimento embrionário observado e as atividades da EROD e da GST medidas. Durante o desenvolvimento embrionário foram observados nos tempos 2-4, 24, 48, 72 e 96 horas variáveis como mortalidade, pigmentação, batimentos cardíacos, defeitos na cauda e defeitos nos olhos. Na análise dos efeitos embriotóxicos, foi utilizado o etanol 2% como controle positivo. Muitos dos parâmetros analisados durante o desenvolvimento embrionário mostraram-se alterados, principalmente batimentos cardíacos reduzidos, pigmentação fraca, defeitos na cauda e alta mortalidade nos embriões expostos às três concentrações da FSA. A fração petróleo solúvel em água induziu a atividade da enzima GST nas concentrações de 33% e 50%, mostrando que houve atuação da referida enzima na eliminação dessas frações do petróleo nos organismos juvenis estudados. No entanto, a atividade da EROD não foi alterada em nenhuma das concentrações da FSA. A fração hidrossolúvel do petróleo mostrou-se embriotóxica para os peixes e alterou a biotransformação da GST. Contudo mais estudos quanto à atividade da EROD serão necessários para definir o melhor tecido e tempo de exposição ao agente tóxico.

Palavras-chaves: *Danio rerio*, fração do petróleo solúvel em água, embriotoxicidade, glutathione S-transferase, etoxiresorufina-*O*-deetilase.

ABSTRACT

The water soluble fraction (WSF) of petroleum causes impacts to the aquatic ecosystem and its initial compounds undergo chemical transformation causing serious damages in several organisms. This fraction of crude oil is a complex mixture that contains polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), phenols and heterocyclic compounds containing sulphur and nitrogen. Studies show that this fraction is very toxic to some fishes species. The present study evaluated possible toxic effects during the early life stage of *Danio rerio* and the biotransformation in juveniles fish of the same specie by the ethoxyresorufin-*O*-deethylase (EROD) and glutathione S-transferase (GST) activities. The embryos and the juveniles fish were exposed to different concentrations of WSF obtained from crude oil (15%, 33% and 50%) for 96 hours. The embryonic development was observed and the EROD and GST activities analysed. During the embryonic development were observed in 2-4, 24, 48, 72 and 96 hours, variables as mortality, pigmentation, heartbeat, tail and eye defects. To the embryotoxic effects analyses, was used ethanol 2% as positive control. Many of the analyzed parameters were altered, as reduced heartbeat, weak pigmentation, tail defects and high mortality in the embryos exposed to the three WSF concentrations. The WSF induced the GST activity at 33% and 50% concentrations, demonstrating that this enzyme plays a role in the elimination of this crude oil fraction in the studied juveniles organisms. However, the EROD activity was not altered in the exposed groups. The WSF of crude oil showed to be embryotoxic and altered the GST biotransformation. However, further enzymatic studies are necessary considering activity in different tissues and time of exposure.

Key-words: *Danio rerio*, water soluble fraction of crude oil, embryotoxicity, glutathione S-transferase, ethoxyresorufin-*O*-deethylase.

